

10/536822

PCT/JP03/15132

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

27.11.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年11月28日

RECEIVED
22 JAN 2004
WIPO PCT

出願番号
Application Number: 特願2002-345210
[ST. 10/C]: [JP 2002-345210]

出願人
Applicant(s): アークレイ株式会社

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

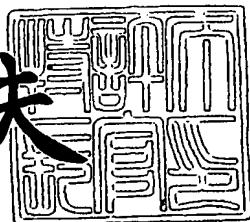
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2004年 1月 7日

今井康夫



特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

出証番号 出証特2003-310897

【書類名】 特許願

【整理番号】 C5R12445

【提出日】 平成14年11月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07H 1/06

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ
株式会社内

【氏名】 平井 光春

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ
株式会社内

【氏名】 村上 淳

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代表者】 土井 茂

【代理人】

【識別番号】 100080621

【弁理士】

【氏名又は名称】 矢野 寿一郎

【電話番号】 06-6944-0651

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001890

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 t -DNAの検出において、試料に含まれる検出阻害物質と核酸とを分離する方法であって、前記核酸を電気的に泳動させることにより、前記試料中から核酸を分離することを特徴とする核酸分離方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸の分離方法に関する。より詳しくは、電気泳動の手法により、目的とする核酸を取出すための核酸分離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、ヒトゲノムの解読が進み、さまざまな生命現象と遺伝子の関連が解明されてきている。そして、この成果により、医学・医療は病態から病因へ、治療から予防へと視野を広げている。ここにおいて、遺伝子検査技術は重要な基盤となっている。

遺伝子検査は、培養困難な病原微生物の同定検査、抗生物質加療中や感染初期の病原微生物の検出、移行抗体が疑われた際の抗原検出、病原微生物の感染源調査、親子鑑定などの個人識別、さらに白血病・ 固形腫瘍の遺伝子レベルの病型診断や遺伝病の確定診断など従来の臨床検査では困難であった検査を行うことができる。そして、結果を得るまでの時間が、菌の培養を用いる手法に比べて短く、培養に時間のかかる細菌の検出には威力を発揮する。さらにDNAは保存条件によっては安定しているため、凍結生検材料、骨など過去の検体からも検査を行うことができる。

また、近年増加傾向にある性感染症の検査において、検査機会の拡大を図るべく、遺伝子検査が注目されている。

【0003】

従来核酸の精製濃縮方法としては、フェノール／クロロホルム／エタノールを

用いた精製方法、核酸を吸着するカラム／フィルターを用いた精製方法、磁性シリカビーズを用いた精製方法等が知られている。

【0004】

さらに、平板状の電気泳動ゲルから核酸を回収する方法として、作成したゲルにおいて核酸を電気泳動し、ゲルにおいて目的とする核酸の位置に回収装置を移動し、更なる電気泳動により目的とする核酸を回収する方法が知られている（例えば、特許文献1参照）。

この他に、平板状の電気泳動ゲルにおいて、核酸を電気泳動して目的とする核酸を分離し、目的とする核酸のバンド近傍に回収チップを挿入して核酸を回収する方法が知られている（例えば、特許文献2参照）。

【0005】

【特許文献1】

実開平5-88296号公報

【特許文献2】

特開平8-327595号公報

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、従来核酸の精製分離方法において、フェノール／クロロホルム／エタノールを用いた精製方法は、劇薬を使用するため、高度の化学設備を必要とするものであり、利用する環境が限定される。そして、操作に手間がかかるとともに、高速遠心が必要となり、自動化が困難である。また、高い精製精度を得ることが困難である。

核酸を吸着するカラム／フィルターを用いた精製方法は、溶液を流しながら行うため、ごみ等の混入量の多いサンプルでは、カラム／フィルターが目詰まりを起こしやすく、精製効率が低くなる可能性がある。そして、遠心もしくは吸引操作を行う必要があるので、自動化が困難である。

さらに、磁性シリカビーズを用いた精製方法は、磁石によるビーズの回収を失敗した場合や、シリカビーズが磁性体より剥落した場合には、サンプルにシリカが混入する可能性ある。そして、高い回収率を得ることが困難である。

【0007】

さらに、平板状の電気泳動ゲルから核酸を回収する従来の技術においては、平板状の電気泳動ゲルを必要とするとともに、この平板状の電気泳動ゲルにおいて一端電気泳動を行い、目的核酸の該当位置のゲルを処理する必要がある。

電気泳動に用いられるゲルは、衝撃に弱く、生成過程により、特性が大きく異なる場合がある。このため、一般に電気泳動を行った後に、紫外線により電気泳動ゲルにおける目的核酸の位置を認識した後に、目的核酸の含有量の多い部分を処理するものである。

【0008】

遺伝子検査等にこの手法を利用する場合には、一回の検査にかかる時間が長くなる。また、電気泳動に用いるゲルが大きくゲルのムラによる核酸のバンドのにじみにより核酸の回収率が低下する可能性がある。さらに、ゲルが大きい場合には、電気泳動に必要となる電力が大きくなる。

【0009】**【課題を解決するための手段】**

上記の課題を解決すべく、本発明は次のような手段を用いる。

核酸を含むサンプルを、分子量によって移動度の差を与える物質により構成される分離媒体に接触させ、電圧を印加することにより核酸を他の物質と分離するものである。そして、分離媒体より抜け出た核酸を、フィルターにより回収するものである。このフィルターは、目的核酸より小さい核酸等が素通りする程度のポアサイズを有するものである。

すなわち、請求項1に記載のごとく、t-DNAの検出において、試料に含まれる検出阻害物質と核酸とを分離する方法であって、前記核酸を電気的に泳動させることにより、前記試料中から核酸を分離するものである。

【0010】

例えば、電気泳動に用いられる分離媒体の一端にバッファで満たされたサンプル供給部を設け、他端に同様にバッファで満たされた採取部を設け、サンプル供給部と採取部とに電圧を印加することにより、サンプルが電気泳動され、分離媒体中を移動する。サンプルに含まれる核酸は分子量により移動速度に差が生じ、

分離媒体を抜けて採取部に溶出するまでの時間が、分子量により異なることとなる。このため、目的の核酸が採取部に溶出し終わると共に電気泳動を終了する、目的の核酸以外の成分を減少できる。また、溶出時間に応じて採取部のバッファを入れ替えることにより目的核酸のみを採取することが出来る。そして、採取部のバッファ量により、目的核酸の濃縮を行うことが出来るものである。

【0011】

このように、遠心もしくは吸引の必要がなく、容易に自動化を行うことができる。また、大容量のサンプルから一度に核酸を分離することができ、溶出時の目的核酸を含む溶液の容量を小さくすることによって、濃縮を行い、目的の核酸濃度の高いサンプルを得ることが出来る。そして、電気泳動の直後において、精製された核酸を扱いやすい状態で得ることができ、次の工程への接続を円滑に行うことが出来るものである。

さらに、他の手法に比べて、高い回収率および高い精度の目的物を得ることが可能である。そして、使用する試薬および機器において高価なものを必要とせず、ランニングコストおよび操作にかかるコストを低減することができる。

【0012】

【発明の実施の形態】

次に、本発明の実施の形態について図を用いて説明する。

図1は核酸濃縮ユニットの構成を示す一部破断面斜視図、図2は同じく平面図、図3は同じく側面図である。

図1から3を用いて、核酸濃縮ユニットの構成について説明する。

濃縮ユニット1は、t-DNAの検出装置において、目的核酸を分離、濃縮するものである。

濃縮ユニット1は注入室2、分離部8、採取室3により構成されている。

そして、ノズル9により目的核酸を含むサンプルを注入室2に導入し、注入室2と採取室3に電圧を印加することにより、核酸を採取室3へと泳動する。分離部8を抜けた目的核酸は採取室3へと溶出し、採取室3において目的核酸を、ノズル10により採取することができるものである。

注入室2に注入されるサンプルとして、血液、尿、喀痰等の生体試料や、飲食

料品等を用いることが可能であり、この他にもゲノム、プラスミド等を注入することが可能である。

【0013】

濃縮ユニット1の各部の構成について、詳しく説明する。

注入室2は分離部8の一端に接続しており、採取室3は分離部8の他端に接続している。注入室には電極5が配設されており、採取室3には電極6および7が配設されている。そして、注入室2および採取室3には電気泳動用のバッファが満たされている。

採取室3の電極6は、注入室2の電極に対向するように配設されており、採取室3の電極7は採取室3の底に設けられている。

採取室3にはフィルター4が配設されており、採取室3を分離部8側と電極6側とに分けている。フィルター4は、目的核酸より小さいもの通過させ、目的核酸以上の大きさのものの通過を阻止するものである。フィルター4には、無数のポアが成形されており、目的核酸と相互作用を起こさず、目的核酸の通過を阻止するポア特性を有するフィルターを用いるものである。

【0014】

フィルター4は、底面と一側面が開口した四角錐形状に構成されている。

フィルター4は開口した底部を分離部8に向け、開口した一側面を上方に向けた構成としている。そして、開口した一側面が水平になるように構成されている。これにより、フィルター4の分離部8側の目的核酸をノズル10により採取することができるものである。また、目的核酸が電気泳動により電極6側に泳動されると、目的核酸がフィルター4の電極6側部分において濃縮される。

【0015】

次に、濃縮ユニットによる目的核酸の濃縮過程について、図4を用いて説明する。図4は目的核酸の濃縮過程を示す図である。

まず、注入室2にサンプルが導入されると、図4(a)に示す状態となる。ここにおいて、説明を容易にするため、サンプルには目的核酸12と目的核酸12より大きい(バルキーもしくは分子量の大きい)核酸11と、目的核酸より小さい核酸12とが含まれるとする。

図4 (a) に示す状態において、大きい核酸11、目的核酸12、小さい核酸13は混じった状態となっている。

そして、電極5と電極6とに電圧を印加すると、大きい核酸11、目的核酸12、小さい核酸13が分離部8に導入され、図4 (b) に示すごとく、分離部8内において移動速度の差が生じる。図4に示す構成では、分離部8にアガロースゲル等を用いるものであり、小さい核酸13が先行して移動する。

【0016】

先行した小さい核酸13は、分離部8を抜けて採取室3に到達する。そして、小さい核酸13は、フィルター4を通過して、採取室3の電極6側に移動する。

この後に、目的核酸12が分離部8を抜けて、採取室3に到達する。そして、図4 (c) に示すごとく、フィルター4により、電極6への移動を阻止される。フィルター4は開口した底部を分離部8に向け、開口した一側面を上方に向いた構成としているので、泳動により、目的核酸12がフィルター4の電極6側部分に濃縮される。

この状態において、電極5・6間に印加を停止し、図4 (d) に示すごとく、電極7・6間に電圧を印加する。この結果、目的核酸より小さい夾雑物は電極6にトラップされたままとなる。電極間の電圧印加を止めると核酸はフィルターから遊離する。

目的核酸12をフィルターから遊離するとともに、電極6側の小さい夾雑物又は小さい核酸13の拡散も抑制し、精製度の高い状態で目的核酸12を濃縮することができるものである。

そして、分離部8を目的核酸12が通過する時間を算出し、注入室2へのサンプル注入から、電極5・6から電極7・6に電圧を印加するタイミングを設定することにより、自動的に目的核酸12の分離、濃縮を行うことができるものである。

【0017】

分離部8は、電気泳動に用いられる各種ゲルを用いることが出来るものであり、例えば、アガロース等を用いることが出来る。

また、カラム充填剤に用いられる分離媒体を利用することも可能である。例え

ば、Sephadex（登録商標）（ファルマシア社製）等のゲルろ過用の担体等を利用することも可能である。

また、電気泳動用ゲルおよびカラム充填剤を分離部8において、組み合わせて、目的核酸が最も先に流出するように調節することも可能である。

【0018】

次に、濃縮ユニットの別構成について、図5および図6を用いて説明する。

図5は濃縮ユニットの開封工程を示す斜視図、図6は濃縮ユニットの側面断面図である。

濃縮ユニットは、検査装置等に挿入され、目的核酸の分離および濃縮を行うものである。

濃縮ユニット16の上面には、フィルム17a・17bが貼着されており、側面には電極5・6が露出している。そして、底面には電極7が露出している。電極5は注入室に、電極6・7は採取室につながっている。濃縮ユニット16内には、分離部8が保持されているとともに、注入室と採取室には電気泳動用のバッファが満たされている。そして、採取室はフィルターにより分離されている。

この状態において、濃縮ユニット16は密封されているとともに、外部よりの電圧印加が可能となっている。このため、濃縮ユニットの取り扱いが容易となる。そして、濃縮ユニット16にサンプルを注入し、目的核酸を採取する場合には、図5に示すごとく、注入室および採取室のフィルム17a・17bを破り、サンプルを注入し、目的核酸を採取するものである。上部にフィルム17a・17bを貼着するので、フィルム17を破る際に、分離部8に大きな衝撃を与えることなく、安定した濃縮分離を行うことができる。

【0019】

【発明の効果】

すなわち、請求項1に記載のごとく、t-DNAの検出において、試料に含まれる検出阻害物質と核酸とを分離する方法であって、前記核酸を電気的に泳動させることにより、前記試料中から核酸を分離するので、

遠心もしくは吸引操作の必要がなく、簡易な装置により分離および濃縮を行うことが出来る。さらに、簡便な構成により分離を行うので、容易に自動化を行う

ことができる。また、大容量のサンプルを一度に精製することができ、溶出時の目的核酸を含む溶液の容量を小さくすることによって、濃縮を行い、濃度の高いサンプルを得ることが出来る。分離および濃縮操作にかかるランニングコストおよび操作にかかる時間を低減することができる。

さらに、自己に存在しない外来遺伝子を同定する検査を容易に行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

核酸濃縮ユニットの構成を示す一部破断面斜視図。

【図2】

同じく平面図。

【図3】

同じく側面図。

【図4】

目的核酸の濃縮過程を示す図。

【図5】

濃縮ユニットの開封工程を示す斜視図。

【図6】

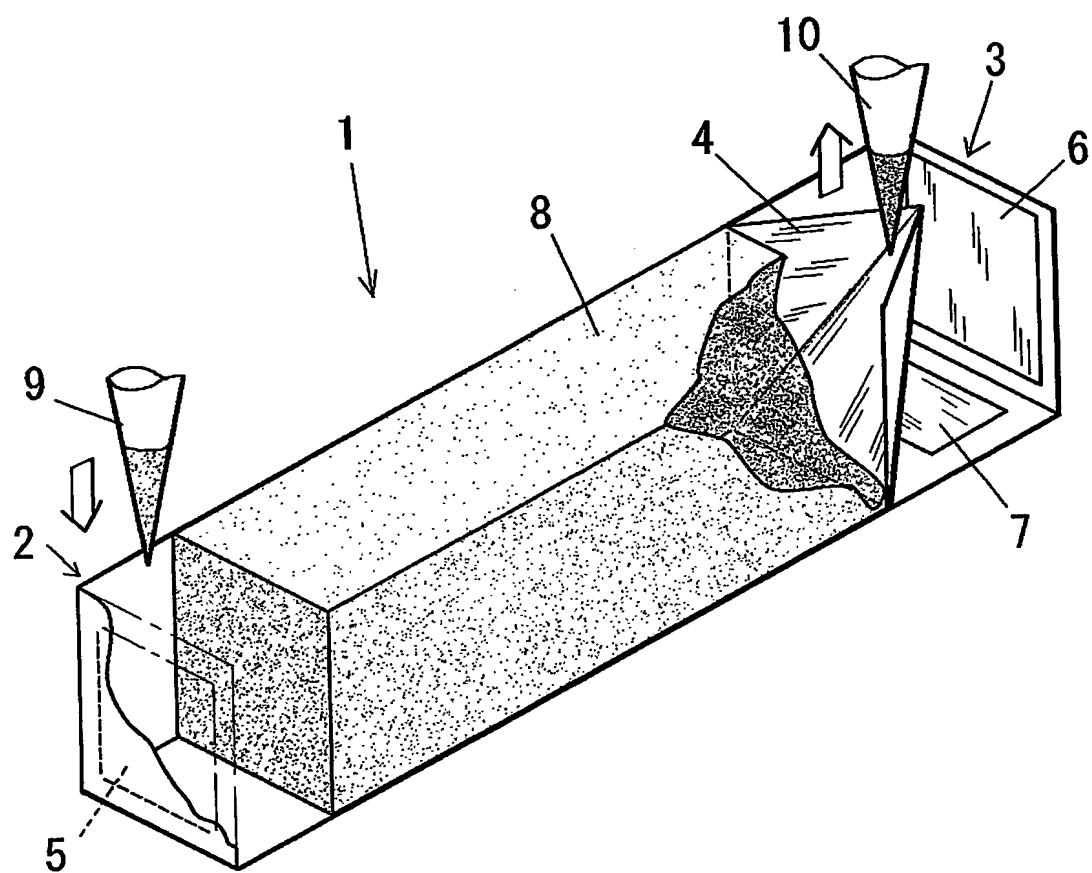
濃縮ユニットの側面断面図。

【符号の説明】

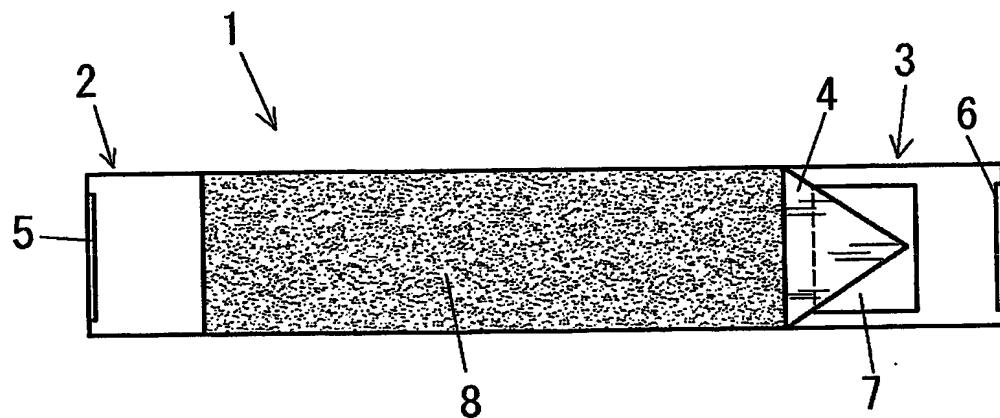
- 1 濃縮ユニット
- 2 注入室
- 3 採取室
- 4 フィルター
- 5・6・7 電極
- 8 分離部
- 9・10 ノズル
- 11・12・13 核酸

【書類名】 図面

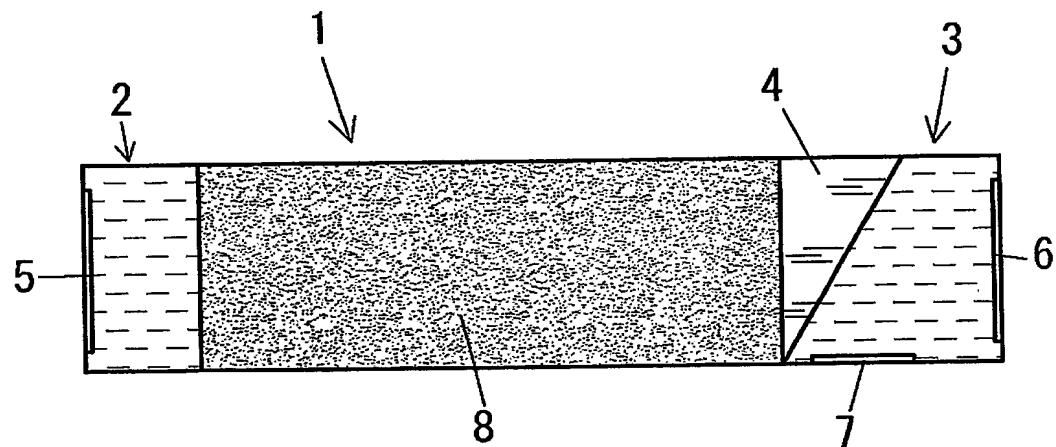
【図1】



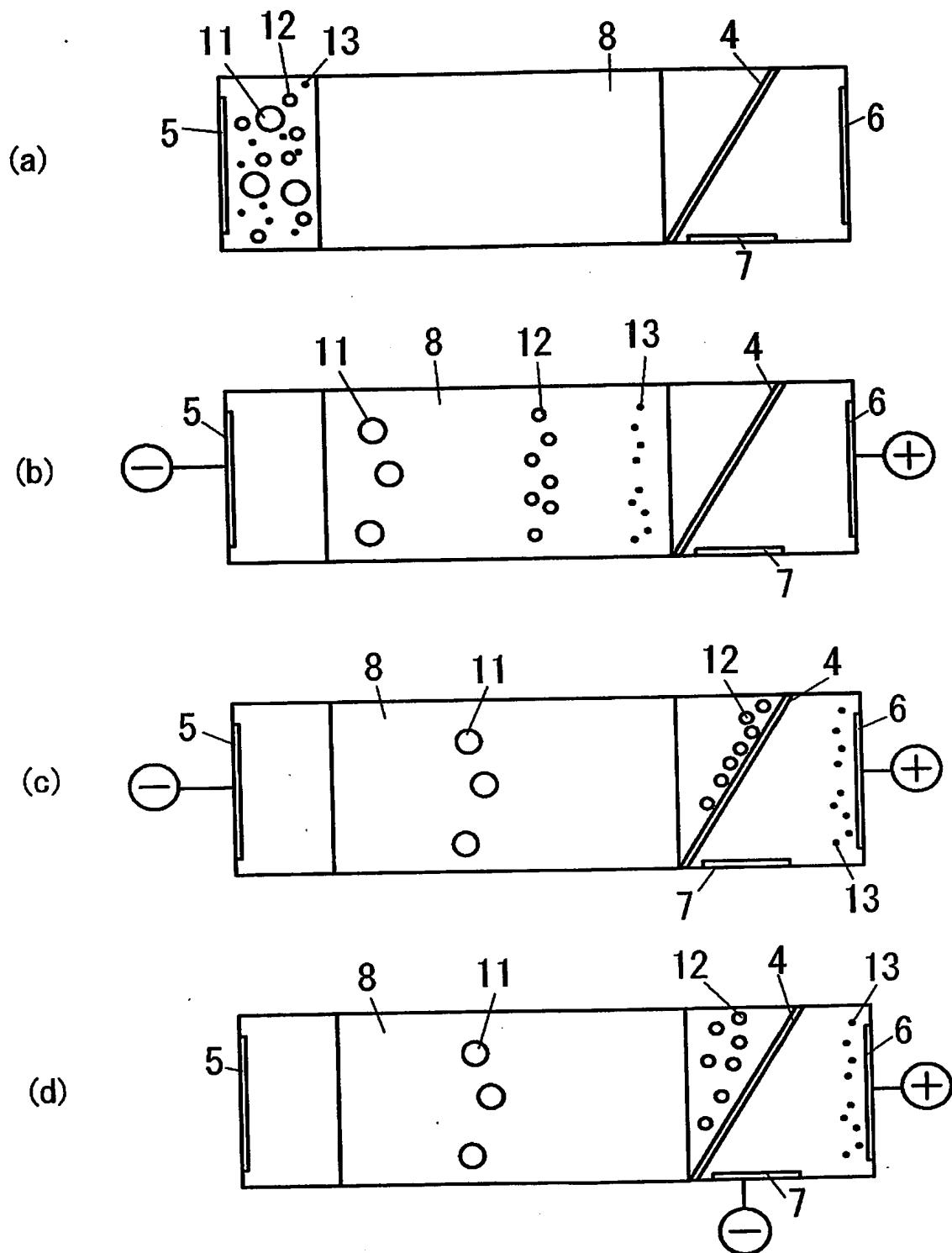
【図2】



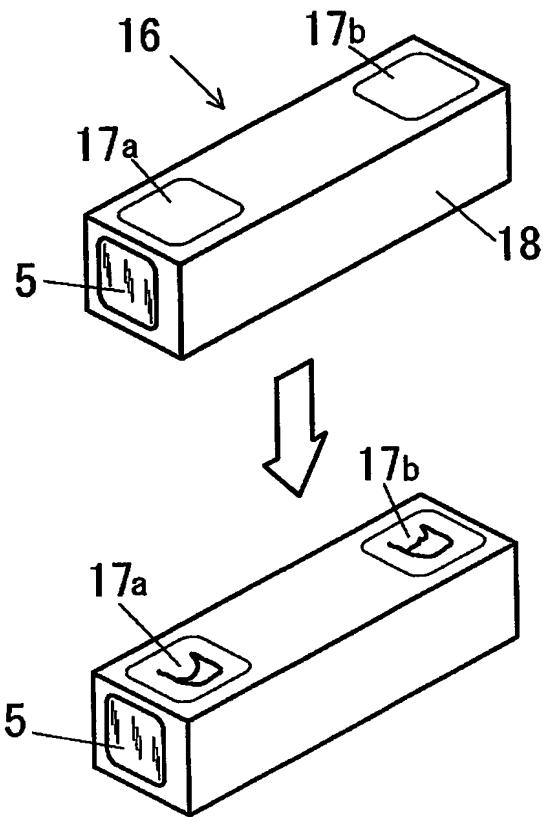
【図3】



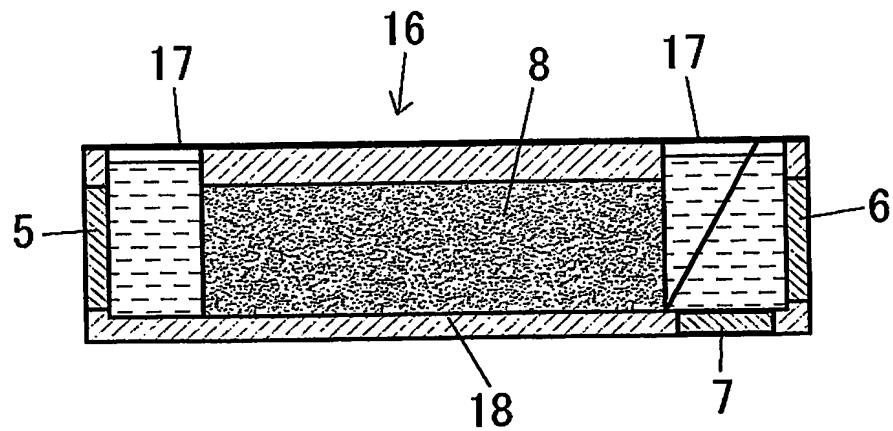
【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 近年、ヒトゲノムの解読が進み、さまざまな生命現象と遺伝子の関連が解明されてきている。そして、この成果により、医学・医療は病態から病因へ、治療から予防へと視野を広げている。ここにおいて、遺伝子検査技術は重要な基盤となっている。そこで、薬剤や高度の化学設備を必要としないとともに、容易な操作と、自動化が容易な核酸の検査装置を構成し、核酸検査の機会を拡大することにより予防医療の促進を行うべく、簡便で精度の高い分離・濃縮を行う方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 t -DNAの検出において、試料に含まれる検出阻害物質と核酸とを分離する方法であって、前記核酸を電気的に泳動させることにより、前記試料中から核酸を分離する。

【選択図】 図1

特願 2002-345210

出願人履歴情報

識別番号 [000141897]

1. 変更年月日 2000年 6月12日
[変更理由] 名称変更
住 所 京都府京都市南区東九条西明田町57番地
氏 名 アークレイ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.